

# RECEPTOR PROTEIN SPECIFICALLY RECOGNIZING BACTERIAL DNA

**Patent number:** JP2002034565 (A)

**Publication date:** 2002-02-05

**Inventor(s):** ARIRA SHIZUO; HENMI HIROAKI +

**Applicant(s):** JAPAN SCIENCE & TECH CORP +

**Classification:**

- international: **A61K38/00; A61K45/00; A61P31/04; A61P35/00; A61P37/08; C07K14/005; C07K14/705; C07K16/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N15/12; C12N5/10; C12P21/08; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566; G01N33/577; C12R1/91; (IPC1-7): A61K38/00; A61K45/00; A61P31/04; A61P35/00; A61P37/08; C07K14/005; C07K16/28; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/08; C12P21/08; C12Q1/68; C12Q1/68; C12R1/91; C12R1/91; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566; G01N33/577**

- european: C07K14/705

**Application number:** JP20000219652 20000719

**Priority number(s):** JP20000219652 20000719

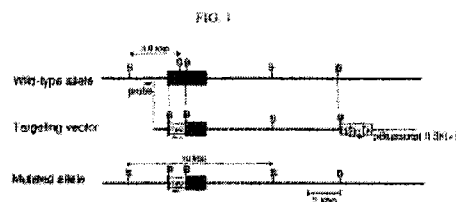
**Also published as:**

EP1302541 (A1)  
EP1302541 (A4)  
EP1302541 (B1)  
US2003124655 (A1)  
US7507872 (B2)

more >>

**Abstract of JP 2002034565 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide the receptor protein that specifically recognizes bacterial DNA bearing the non-methylated CpG sequence, the gene DNA coding the same and experimental model animals that are useful for examining the response of host immunocyte to bacterial infections. **SOLUTION:** The DNA encoding the receptor protein that specifically recognizes the bacterial DNA bearing the non-methylated CpG sequence is screened by the BLAST search, a plurality of EST clones having high similarity to various kinds of TLS are screened and they are used as probes to isolate the full-length cDNA from the mouse macrophage cDNA library, the base sequence of the cDNA is analyzed to confirm that the TLR9 has the conserved areas such as the areas of LRR, TIR and the like. Then, the knockout mouse is established and the TLR9 is confirmed to be a receptor protein of the nucleotide including the non-methylated CpG sequence of the bacterial DNA.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-34565  
(P2002-34565A)

(43) 公開日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 J
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 31/04	4 B 0 2 4
45/00		35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/04		37/08	4 B 0 6 4
35/00		C 0 7 K 14/005	4 B 0 6 J
審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 32 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-219652(P2000-219652)

(22) 出願日 平成12年7月19日(2000.7.19)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 審良 静男

大阪府高槻市辻子1丁目7-16

(72) 発明者 辺見 弘明

大阪府茨木市北春日丘4-11-47-112

(74) 代理人 10010/984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質

(57) 【要約】

【課題】 非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質や、それをコードする遺伝子DNAや、細菌性伝染病に対する宿主免疫細胞の応答性を調べる上で有用な実験モデル動物を提供すること。

【解決手段】 非メチル化C p G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAを、BLASTサーチによりスクリーニングし、各種TLRと高い相似性を有する多くのESTクローンをスクリーニングし、これらをプローブにしてマウスマクロファージcDNAライブラリーから完全長cDNAを単離し、cDNAの塩基配列を解析してLRR及びTIR領域などの保存領域が存在するTLR9であることを確認した後、ノックアウトマウスを作製し、TLR9が細菌DNAの非メチル化C p G配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体タンパク質であることを確認した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA。

【請求項2】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項1記載のDNA。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質

【請求項3】 配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1記載のDNA。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項1記載のDNA。

【請求項5】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項1記載のDNA。

(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質

【請求項6】 配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1記載のDNA。

【請求項7】 請求項6記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項1記載のDNA。

【請求項8】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質。

【請求項9】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質。

【請求項10】 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質。

【請求項11】 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質。

【請求項12】 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質。

【請求項13】 請求項8～12のいずれか記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

【請求項14】 請求項8～12のいずれか記載のタンパク質と特異的に結合する抗体。

【請求項15】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項14記載の抗体。

【請求項16】 請求項8～12のいずれか記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項17】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項18】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

【請求項19】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不反応性であることを特徴とする請求項18記載の非ヒト動物。

【請求項20】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項17～19のいずれか記載の非ヒト動物。

【請求項21】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項1～7のいずれか記載のDNAを導入することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法。

【請求項22】 請求項21記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞の調製方法により得られることを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞。

【請求項23】 被検物質の存在下、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項24】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のTLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項25】 非メチル化CpG配列を有する細菌D

NAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のTLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項26】 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項24又は25記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項27】 請求項23～26のいずれか記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法により得られる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニスト。

【請求項28】 非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の全部又はその一部を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項29】 請求項27記載のアゴニスト又はアンタゴニストを有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項30】 検体中の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAと、請求項3記載のDNAとの塩基配列を比較することができる、請求項3記載のDNAを含むことを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質、該受容体タンパク質の遺伝子及びそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】トール (Toll) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 52, 269-279, 1988, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996)、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている (Cell 86, 973-983, 1996)。かかるTollは、細胞外領域にロイシンリッチリピート (LLR) を有するI型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン-1受容体 (IL-1R) の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている (Nature 351, 355-356, 1991, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996, J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998)。

【0003】近年、Toll様受容体 (TLR) と呼ばれるTollの哺乳類のホモログが同定され、TLR2やTLR4など現在までに6つのファミリーが報告されている (Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998, Blood 91, 4020-4027, 1998, Gene 231, 59-65, 1999)。このTLRファミリーは、上記IL-1Rと同様にアダプタータンパク質であるMyD88を介し、IL-1R結合キナーゼ (IRAK) をリクルートし、TRAF6を活性化し、下流のNF- $\kappa$ Bを活性化することが知られている (J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998, Mol. Cell 2, 253-258, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999)。また、哺乳類におけるTLRファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (PRR: pattern recognition receptor) として、先天的な免疫認識に関わっているとも考えられている (Cell 91, 295-298, 1997)。

【0004】上記PRRにより認識される病原体会合分子パターン (PAMP: pathogen-associated molecular pattern) の一つは、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (LPS) であって (Cell 91, 295-298, 1997)、かかるLPSが宿主細胞を刺激して宿主細胞にTNF $\alpha$ 、IL-1及びIL-6等の各種炎症性サイトカインを産生させること (Adv. Immunol. 28, 293-450, 1979, Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995) や、LPS結合タンパク質 (LBP: LPS-binding protein) により捕獲されたLPSが細胞表面上のCD14に引き渡されることが知られている (Science 249, 1431-1433, 1990, Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995)。本発明者らは、TLR4のノックアウトマウスを作製し、TLR4ノックアウトマウスが上記グラム陰性菌の外膜の主成分であるLPSに不応答性であること (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) や、TLR2ノックアウトマウスを作製し、TLR2ノックアウトマウスのマクロファージがグラム陽性菌細胞壁やその構成成分であるペプチドグリカンに対する反応性が低下すること (Immunity, 11, 443-451, 1999) を報告している。

【0005】他方、細菌DNA (バクテリア由来DNA) や非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドが、マウス及びヒトの免疫細胞を刺激すること (Trends Microbiol. 4, 73-76, 1996 Trends Microbiol. 6, 496-500, 1998) や、IL-12及びIFN $\gamma$ の放出に支配されるTヘルパー1細胞 (Th1) 様炎症性応答を刺激すること (EMBO J. 18, 6973-6982, 1999 J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9305-9310, 1999) から、CpG配列を含むオリゴヌクレオチドは、癌、アレルギー及び伝染病のワクチンを含むワクチン戦略のアジュバントとしての使用可能性が提唱されている (Adv. Immunol. 73, 329-368, 1999 Curr. Opin. Immunol. 12, 35-43, 2000 Immunity 11, 1

23-129, 1999) このように臨床実用において効果が期待されるにも関わらず、非メチル化CpG配列を含む細菌DNAが免疫細胞を活性化する分子メカニズムはよくわかっていない。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、メチル化されていないCpGモチーフを含有するバクテリア由来DNAは免疫細胞を非常に活性化し、Th1の応答を誘導するが、その分子レベルでの活動はあまり理解されていない。本発明の課題は、細菌DNAの非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドの分子レベルでの作用を明らかにすることができる、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識するTLRファミリーのメンバー受容体タンパク質TLR9や、それをコードするDNAや、細菌性伝染病に対する宿主免疫細胞の応答性を調べる上で有用な実験モデル動物を提供することにある。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体として、先天的な免疫認識に関わっている哺乳類におけるTLRファミリーは、現在までに6つのメンバー(TLR1-6)が公表されており(Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 588-593, 1998, Gene 231, 59-65, 1999)、TLR7及びTLR8の新たな2つのメンバーがGenBankに登録されている(登録番号AF240467及びAF246971)。また、TLR9についても完全長cDNAが見い出されGenBankに登録されている(登録番号AF245704)が、その機能については知られていなかった。

【0008】本発明者らは、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識するTLRファミリーのメンバー受容体タンパク質をコードするDNAを、BLASTサーチによりスクリーニングし、既に同定されている各種TLRと高い相似性を有する多くのシークエンス・タグ(EST)クローンをスクリーニングし、これらの遺伝子フラグメントをプローブにしてマウスマクロファージcDNAライブラリーから完全な長さを有するcDNAを単離し、これを用いてヒトcDNAも単離した。次に、これらcDNAの塩基配列を解析し、このTLRファミリーにLRP及びTIR領域などの保存領域が存在するTLR9であることを確認した。そこでこのTLR9ノックアウトマウスを作製し、TLR9が細菌DNAの非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体タンパク質であることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA(請求項1)や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タ

ンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項1記載のDNA(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質(請求項2)や、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1記載のDNA(請求項3)や、請求項3記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項1記載のDNA(請求項4)や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質が、以下の(a)又は(b)のタンパク質であることを特徴とする請求項1記載のDNA(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質(請求項5)や、配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むことを特徴とする請求項1記載のDNA(請求項6)や、請求項6記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする請求項1記載のDNA(請求項7)に関する。

【0010】また本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質(請求項8)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質(請求項9)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質(請求項10)や、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質(請求項11)や、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項8記載のタンパク質(請求項12)に関する。

【0011】また本発明は、請求項8～12のいずれか記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質(請求項13)や、請求項8～12のいずれか記載のタンパク質と特異的に結合する抗体(請求項14)や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項14記載の抗体(請求項15)や、請求項8～12のいずれか記載のタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞(請求項16)に関する。

【0012】また本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現することを特徴とする非ヒト動物（請求項17）や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物（請求項18）や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不反応性であることを特徴とする請求項18記載の非ヒト動物（請求項19）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項17～19のいずれか記載の非ヒト動物（請求項20）に関する。

【0013】また本発明は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項1～7のいずれか記載のDNAを導入することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質を発現する細胞の調製方法（請求項21）や、請求項21記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞の調製方法により得られることを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞（請求項22）に関する。

【0014】また本発明は、被検物質の存在下、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項23）や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のTLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項24）や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のTLR9活性を測定・評価することを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項25）や、非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項24又は25記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項26）に関する。

【0015】また本発明は、請求項23～26のいずれか記載の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法により得られる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニスト（請求項27）や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の全部又はその一部を有効成分として含有する医薬組成物（請求項28）や、請求項27記載のアゴニスト又はアンタゴニストを有効成分として含有する医薬組成物（請求項29）や、検体中の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAと、請求項3記載のDNAとの塩基配列を比較することができる、請求項3記載のDNAを含むことを特徴とする非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キット（請求項30）に関する。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】本発明における非メチル化CpG配列を有する細菌DNAとしては、T細胞、B細胞、抗原提示細胞等の免疫細胞を活性化し、免疫応答を誘導することができる、メチル化されていないCpGモチーフを有するオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）等のバクテリアに由来するDNAであればどのようなものでもよく、エセリシア・コリ、クレブシェラ・ニューモニエ、シュドモナス・アエルギノサ、サルモネラ・チフィウム、セラチア・マルセッセンス、フレクサナー赤痢菌、ビブリオ・コレレ、サルモネラ・ミネソタ、ボルフィロモナス・ジンジバリス、スタフィロコッカス・アウレウス、コリネバクテリウム・ジフテリア、ノカルジア・コエリアカ、ストレプトコッカス・ニューモニアなどのバクテリア由来のDNAを具体的に挙げるができる。

【0017】かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質としては、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識することができるタンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、配列表の配列番号2で示されるヒト由来のTLR9や、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識することができるタンパク質や、これらの組換えタンパク質を具体的に挙げるができる。かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質は、そのDNA配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。

【0018】また、本発明の非メチル化CpG配列を有

する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号2で示されるヒト由来のTLR9をコードするDNA、例えば配列番号1で示されるものや、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識することができるタンパク質をコードするDNAや、これらDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識することができるタンパク質をコードするDNAも包含され、これらはそのDNA配列情報等に基づき、例えばマウス由来のTLR9においてはマウスRAW264.7cDNAライブラリーや129/SvJマウス遺伝子ライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。

【0019】また、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、マウス由来のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、受容体タンパク質TLR9と同効な目的とする免疫誘導非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0020】本発明の融合タンパク質とは、マウス、ヒト等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した非メチル化Cp

G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の精製や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の検出や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0021】本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば、TLR9の変異又は欠失に起因する疾病の診断やTLR9の制御分子機構を明らかにする上で有用である。

【0022】非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。以下に非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質として、マウス由来のTLR9を例に挙げてマウス由来のTLR9に対して特異的に結合するモノクローナル抗体、すなわち抗mTLR9モノクローナル抗体の作製方法を説明する。

【0023】上記抗mTLR9モノクローナル抗体は、抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをインビボ又はインビトロで常法により培養することにより生産することができる。例えば、インビボ系においては、齧歯動物、好ましくはマウス又はラットの腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むRPMI 1640又はMEM等の細胞培養培地を例示することができる。

【0024】抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、例えば、マウス等から得られた受容体タンパク質TLR9を用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの脾臓細胞とマウスNS-1細胞(ATCC TIB-18)とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗mTLR9モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出することができる。また、かかるモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、アフィニティークロマトグラフィー等の液体クロマトグラフィーを具体的に例示することができる。

【0025】また、本発明の上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する一本鎖抗体をつくるためには、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

【0026】また上記抗mTLR9モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC(フルオレセインイソシアネート)又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 又は $^3\text{H}$ 等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の機能解析を行うことができる。また免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、ブランク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

【0027】本発明はまた、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986)及びSambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スボドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げることができる。

【0028】また、発現系としては、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0029】上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997)らの方法などを用いることができ、また、かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラ



フィーに用いるカラムとしては、例えば、抗TLR9モノクローナル抗体等の抗非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質抗体を結合させたカラムや、上記TLR9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、これらの非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を得ることができる。

【0030】本発明において、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいい、また、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する機能を失った非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、ウサギや、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0031】また、本発明において非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不反応性とは、細菌DNAによる刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われていることを意味する。したがって、本発明において非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不反応性の非ヒト動物とは、細菌DNAによる刺激に対して、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいう。また、細菌DNAによる刺激としては、細菌DNAを生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞に細菌DNAを接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができ、具体的には、TLR9ノックアウトマウス等のTLR9遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を挙げることができる。

【0032】ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによ

って個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

【0033】例えば、TLR9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

【0034】この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロビア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質ノックアウトマウスを作製することができる。また、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識

する受容体タンパク質ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0035】また、作出されたTLR9ノックアウトマウスが非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して不応答性であることは、例えば、CpG ODNをTLR9ノックアウトマウスのマクロファージ、単核細胞、樹状細胞などの免疫細胞にインビトロ又はインビボで接触せしめ、かかる細胞におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 等の産生量や、脾臓B細胞の増殖応答や、脾臓B細胞表面でのCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原の発現量や、NF- $\kappa$ B、JNK、IRAK等のTLR9のシグナル伝達経路における分子の活性化を測定することにより確認することができる。そして、本発明のTLR9ノックアウトマウスは、非メチル化CpG配列を有する細菌DNA等の作用機序の解明や細菌感染に対するワクチン開発に有用なモデルとすることができる。

【0036】非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のトランスジェニックマウスは、TLR9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするcDNAにチキン $\beta$ -アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーター、及びラビット $\beta$ -グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0037】また、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAの全部あるいは一部を用いると、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の欠失又は異常に起因する疾病等の遺伝子治療に有効な細胞を調製することができる。本発明におけるこれら細胞の調製方法としては、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、上記本発明のDNAの全部あるいは一部をトランスフェクション等により導入し、非メチル化Cp

G配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞を得る方法を挙げることができ、特に、かかる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞としては、上記DNA等が染色体にインテグレートされ、ステイブルにTLR9活性を示す細胞を用いることが好ましい。

【0038】そしてまた、上記非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に対する抗体、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現する非ヒト動物、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞等を用いると、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストや、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対する反応性の抑制物質又は促進物質をスクリーニングすることができる。これらのスクリーニングにより得られたものは、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、アレルギー性疾患若しくは癌に対する抑制剤、予防剤又は治療薬や、遺伝子治療等において副作用を抑制剤又は阻害剤や、TLR9活性の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質である可能性がある。

【0039】上記TLR9活性とは、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAと特異的に反応し、細胞内にシグナルを伝達する機能をいい、シグナル伝達機能としては、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 等のサイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- $\kappa$ B、JNK、IRAK等のTLR9のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などを具体的に例示することができるが、これらに限定されるものではない。

【0040】本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法としては、被検物質の存在下、マクロファージ、脾臓細胞又は樹状細胞などの免疫細胞、非メチル化CpG配列を有す

る細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現している細胞、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質を発現する細胞等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質を発現している細胞をインビトロで培養し、TLR9活性を測定・評価する方法や、野生型非ヒト動物、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物、又は、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子が過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ、脾臓細胞、又は樹状細胞などの免疫細胞のTLR9活性を測定・評価する方法等を具体的に挙げることができる。

【0041】また、マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。このことは、以下に示す非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対する反応性の抑制物質又は促進物質のスクリーニングにおいても同様である。

【0042】また、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対する反応性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法としては、被検物質と非メチル化CpG配列を有する細菌DNAとの存在下、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質、又は該タンパク質を発現している細胞膜をインビトロでインキュベーションし、該タンパク質との反応性を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を非メチル化CpG配列を有する細菌DNAの存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と非メチル化CpG配列を有する細菌DNAとをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロ

ファージ又は脾臓細胞を非メチル化CpG配列を有する細菌DNAの存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ若しくは脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法や、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対して反応性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価する方法などを具体的に挙げることができる。また、これらのスクリーニング方法に用いる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAとしては、CpG ODN (TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT: 配列番号5) を用いることが好ましいが、これに限定されるものではない。

【0043】本発明はまた、検体中の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列を、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列と比較することからなる、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾病の診断に用いられる診断キットに関する。非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAの変異型の検出は、遺伝子に変異がある個体をDNAレベルで見い出す

ことにより行うことができ、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の過少発現、過剰発現又は変異発現により生ずる疾病の診断に有効である。かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものをを用いることもできる。そして、塩基配列の欠失や挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出でき、また点突然変異は増幅DNAを標識非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズさせることで同定することができる。このように、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードする遺伝子の変異を検出することで、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾病の診断又は判定をすることができる。

【0044】本発明はまた、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾患の診断用プローブ、及び当該プローブ及び／又は本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体を含有してなる非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質の活性又は発現と関連する疾患の診断キットに関する。前記診断用プローブとしては、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA(cDNA)又はRNA(cRNA)のアンチセンス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ(少なくとも20ベース以上)を有するものであれば特に制限されるものではない。かかるプローブ及び／又は本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質に特異的に結合する抗体を細菌感染症等のような症状の疾患の診断薬の有効成分とするためには、プローブが分解されないような適当なバッファー類や滅菌水に溶解することが好ましい。また、これらの診断薬を用いた、免疫染色法(Dev.Biol. 170, 207-222, 1995, J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996)や、In situハイブリダイゼーション法(J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996)や、in situ PCR法等の方法により細菌感染症等のような症状の疾患を診断することもできる。

【0045】本発明の医薬組成物としては、TLR9等の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に

認識する受容体タンパク質の全部又はその一部や、上記受容体タンパク質のアゴニストやアンタゴニストを含むものであれば、どのようなものでもよい。具体的には、細菌感染症に対するワクチンや、癌に対するワクチンや、気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患の治療薬や、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療や遺伝子治療において障害となるCpGモチーフの存在による副作用の克服剤・抑制剤・阻害剤などを挙げることができる。

【0046】前記のように、本発明の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病の診断キットとしては、TLR9をコードするDNAを含むものであればどのようなものでもよく、かかるTLR9をコードするDNAと検体中の非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNAとの塩基配列を比較することにより、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質をコードするDNA配列の欠失、置換及び／又は付加に関連する疾病、例えば、癌、アレルギー、伝染病等の診断が可能となる。

【0047】

【実施例】以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

実施例1(TLR9のクローニング)

ヒトTLR4のDNA配列情報を用いて、GenBankをサーチした結果、相同性がきわめて高いマウスEST(登録番号AA273731; マウス)を見い出した。このマウスESTのPCR増幅産物をプローブとして、マウスRAW264.7 cDNAライブラリーをスクリーニングし、完全なTLR9オープンリーディングフレームを含む配列番号3に示される完全長のcDNAクローンを単離した。このマウスTLR9のDNA配列情報を用いてGenBankをサーチし、高い相同性を有するヒトゲノム配列を見い出した。このヒトゲノム配列に基づいて、cDNA端部を増幅し、U937細胞(J. Immunol. 163, 5039-5048, 1999)から、配列番号1に示される塩基配列を有する完全長のヒトTLR9のcDNAを単離した。

【0048】実施例2(TLR9ノックアウトマウスの作製)

129/SvJマウス遺伝子ライブラリー(ストラタジーン社製)からTLR9ゲノムDNAを単離し、pBluescript II SK(+)ベクター(ストラタジーン社製)中でサブクローニングし、制限酵素マッピング及びDNA配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、LRRL(ロイシンリッチリピート)領域の一部分をコードする1.0 kbのフラグメントを、ネオマイシン耐性遺伝子

カセット (pMC1-neo; ストラタジーン社製) に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) を挿入することにより構築した (図1)。このターゲッティングベクターを線状化し、胎生14.1日目の胚幹細胞 (ES細胞) にエレクトポレーションし、G418及びガンシクロビアに抵抗性を示す292個のクローンを選択し、PCR法及びサザンブロット法により14個のクローンをスクリーニングした。

【0049】突然変異TLR9対立遺伝子を含有していた3個の標的ESクローンを、C57BL/6マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスをC57BL/6雌マウスと交配させ、ヘテロ接合体F1マウスを作製し、かかるヘテロ接合体F1マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウス (TLR9ノックアウトマウス: TLR9<sup>-/-</sup>) を得た (図2)。なお、ホモ接合体マウスの確認は、マウスの尾から抽出した各ゲノムDNAをScaIでダイジェストし、図1に示すプローブを用いたサザンブロット法により行った。本発明のTLR9ノックアウトマウス (TLR9<sup>-/-</sup>) はメンデルの法則に従い作製することができ、12週目までは顕著な異常を示さなかった。

【0050】突然変異によりTLR9遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、野生型マウス (+/+ ) 及びTLR9ノックアウトマウス (-/-) の脾臓細胞から抽出した全RNA (10 $\mu$ g) を電気泳動にかけナイロン膜に移して、<sup>32</sup>Pで標識したTLR9のC-末端フラグメント若しくはN-末端フラグメント、又は $\beta$ -アクチン ( $\beta$ -actin) に特異的なcDNAを用いてノーザンブロット分析を行った (図3)。これらの結果から、TLR9 mRNAのN-末端フラグメントはTLR9ノックアウトマウスの脾臓細胞からは検出されなかった。また、C-末端フラグメントをプローブとした場合、変異マウス由来のTlr9の転写は野生型マウス由来のものと同様サイズのものが検出されたが、生産量においては少ないことがわかった。そこで、変異マウスから得られた脾臓細胞のmRNAを用いてRT-PCR法を行い、得られた生成物の配列分析を行った。この結果、転写されたTlr9遺伝子にはneo遺伝子が含まれており、このneoの挿入によってTLR9のN-末端部位にストップコドンが出現し、変異マウスにおいて機能的なTLR9タンパク質が発現しないことがわかった (図4)。なお、TLR9ノックアウトマウスのリンパ細胞をフローサイトメトリーで測定した結果、異常成分は見られなかった。

【0051】実施例3 (腹腔マクロファージの調製) 野生型マウス (wild-type) 及びTLR9ノックアウトマウス (TLR9<sup>-/-</sup>) のそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸培地 (DIFCO社製) を2m

lずつ注入し、3日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を10%のウシ胎仔血清 (GIBCO社製) を添加したRPMI 1640培地 (GIBCO社製) 中で37℃にて2時間培養し、氷温のハンス緩衝液 (Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO社製) で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

【0052】実施例4 (TLR9ノックアウトマウスの非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに対する応答性)

最近、CpG ODN (oligodeoxynucleotide) の応答性は、TLRを介するシグナル伝達経路の中のアダプタータンパク質であるMyD88に依存していることが明らかになった。このMyD88ノックアウトマウスはCpG ODNに対して応答しないが、TLR2ノックアウトマウスやTLR4ノックアウトマウスは正常にCpG ODNに対して応答する。これらのことは、CpG ODNがTLR2及びTLR4以外のTLRによって認識されることを示している。そこでTLR9ノックアウトマウスのCpG ODNに対する応答性を調べてみた。まず、腹腔マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生量を以下のように測定した。

【0053】実施例3により調製した各腹膜マクロファージをINF $\gamma$  (30 unit/ml) の存在下又は非存在下において、図5に示された各種濃度のCpG ODN (0.1又は1.0 $\mu$ M; TIB MOLBIOL社製; TC-C-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT)、PGN (10 $\mu$ g/ml; Sigma and Fluka社製; スタフィロコッカス・アウレウス由来)、LPS (1.0 $\mu$ g/ml; Sigma社製; サルモネラ・ミネソタRe-595由来) といっしょに24時間培養した。培養後、培養上清中のTNF $\alpha$ 、IL-6及びIL-12 p40の各濃度をELISA法により測定した。この結果を図5に示す。これらの結果から、野生型マウス (Wild-type) のマクロファージはCpG ODNに応答してTNF $\alpha$ 、IL-6及びIL-12を産生し、さらにINF $\gamma$ 及びCpG ODNで刺激すると、TNF $\alpha$ 、IL-6及びIL-12の産生量が増加することがわかった。しかし、TLR9ノックアウトマウス (TLR9<sup>-/-</sup>) 由来のマクロファージは、INF $\gamma$ の存在下でさえ、CpG ODNに対する応答において検出可能なレベルの炎症性サイトカインを産生していなかった。また、野生型マウス及びTLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージは、LPS又はPGNに対する応答によりTNF $\alpha$ 、IL-6及びIL-12をほぼ同程度産生することがわかった (図5)。なお、それぞれの実験結果はn=3の平均値を示す。図中のN.D. は検出できなかったことを示す。

【0054】また、CpG ODN又はLPSに対する

野生型マウス (Wild-type) 及びTLR9ノックアウトマウス (TLR9<sup>-/-</sup>) の脾臓細胞の応答性について調べてみた。それぞれのマウスの脾臓細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を単離し、図6に示す各種濃度のCpG ODN又はLPSにより96ウェルプレート内で培養して脾臓細胞を刺激した。培養から40時間後に1  $\mu$ Ciの [ $^3$ H] -チミジン (デュボント社製) を添加して更に8時間培養し、 [ $^3$ H] の摂取量を $\beta$ シンチレーションカウンター (パッカード社製) で測定した (図6)。この結果から、野生型マウスの脾臓細胞では、CpG ODNやLPSの投与量に依存して細胞増殖反応を促進していたが、TLR9ノックアウトマウスの脾臓細胞では、いかなる濃度のCpG ODN刺激においてもCpG ODNによる細胞増殖反応は見られなかった。また、CpG ODNに応答して、野生型マウス由来のB細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスIIの発現が増加した。しかし、TLR9ノックアウトマウス由来のB細胞ではCpG ODNに誘導されたMHCクラスIIの発現の増加は見られなかった。以上のことから、TLR9ノックアウトマウスのマクロファージやB細胞は、CpG ODNに対する応答性を特異的に欠如していることがわかった。

【0055】次に、CpG ODNを含有するバクテリア由来DNAは樹状細胞を潜在的に刺激しTh1細胞の発達をサポートすることが知られている (EMBO J. 18, 6973-6982, 1999; J. Immunol. 161, 3042-3049, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9305-9310, 1999)。そこでCpG ODN誘導サイトカインの産生と、骨髄由来の樹状細胞の表面分子のアップレギュレーションを分析した。野生型マウス (Wild-type) 又はTLR9ノックアウトマウス (TLR9<sup>-/-</sup>) の骨髄細胞を、10 ng/mlのマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Peprotech社製) を含む10%のウシ胎児血清を添加したRPMI 1640培地で培養し (J. Exp. Med. 176, 1693-1702, 1992)、培養後6日目に未成熟の樹状細胞を回収し、0.1  $\mu$ MのCpG ODN又は0.1  $\mu$ g/mlのLPSの存在下若しくは非存在下において、10%のウシ胎児血清を添加したRPMI 1640培地中で2日間培養した。培養後、上清中のIL-12 p40の濃度をELISA法で測定した (図7)。この結果から、野生型マウス由来の樹状細胞はCpG ODNに応答してIL-12を産生したが、TLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞においてはCpG ODNはIL-12の産生を誘導しなかった。

【0056】上記10 ng/mlのマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Peprotech社製) を含む10%のウシ胎児血清を添加したRPMI 1640培地で培養し、6日目に回収された樹状細胞を、CD40、CD80、CD86及びMHCクラスIIに対する、それ

ぞれのビオチン化抗体により染色し、フィコエリトリン (phycoerythrin: PE; ファーミンジェン社製) で標識したストレプトアビジンで発展させ、これらの細胞をセルクエストソフトウェア (ベクトンディッキンソン社製) により蛍光活性化セルソーターキャリバー (FACS Calibur) で分析した (図8)。この結果から、CpG ODNで刺激すると、野生型マウス由来の樹状細胞表面においては、CD40、CD80、CD86及びMHCクラスIIの発現を促進していたが、TLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞表面では、CpG ODNに対する応答によりこれらの分子の発現を促進しなかった (図8)。LPSによる刺激では、野生型マウス由来の樹状細胞もTLR9ノックアウトマウス由来の樹状細胞も同様の応答がみられた。以上の結果から、TLR9はCpG ODNの細胞応答に不可欠な受容体であることがわかった。

【0057】実施例5 (TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージのCpG ODNに対する応答によるNF- $\kappa$ B、JNK及びIRAKの活性化)  
TLRのシグナルは、アダプター分子であるMyD88を介してセリン/トレオニンキナーゼであるIRAKを活性化し、次いでMAPキナーゼ及びNF- $\kappa$ Bを活性化することが知られている (Immunity 11, 115-122, 1999)。そこでCpG ODNが、かかる細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを調べてみた。実施例3により調製した野生型マウス及びTLR9ノックアウトマウスの腹腔マクロファージ ( $1 \times 10^6$  cells) を、1.0  $\mu$ MのCpG ODN又は1.0  $\mu$ g/mlのサルモネラ・ミネソタRe-595のLPSで図9に示された時間刺激し、各マウスのマクロファージから核蛋白質を抽出し、NF- $\kappa$ BのDNA結合部位を含む特異的プローブといっしょにインキュベートし、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにより視覚化した (図9)。

【0058】この結果から、CpG ODNで刺激すると、野生型マウス由来のマクロファージではNF- $\kappa$ BのDNA結合活性が増加するのに対し、TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージではNF- $\kappa$ BのDNA結合活性は増加しなかった。TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージをLPSで刺激したものは、野生型マウス由来のマクロファージをLPSで刺激したものと同様のNF- $\kappa$ Bの活性化が見られた。以上の結果から、CpG ODNの誘導によるNF- $\kappa$ Bの活性がTLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージにおいて特異的に欠損していることがわかる。なお、図中の矢印はNF- $\kappa$ Bと特異的プローブとの複合物の位置を示し、矢頭は特異的プローブのみの位置を示している。

【0059】上記と同様に図10又は図11で示された時間、CpG ODN又はLPSで刺激した野生型マウ

ス及びTLR9ノックアウトマウスのマクロファージを、溶解緩衝液（最終濃度で1.0%のトリトンX-100、137mMのNaCl、20mMのトリス-HCl、5mMのEDTA、10%のグリセロール、1mMのPMSF、20μg/mlのアプロチニン、20μg/mlのロイペプチン、1mMのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>及び10mMのβ-グリセロリン酸を含有する緩衝液；pH8.0）中にて溶解し、この細胞溶解物を抗JNK抗体（サンタクルス社製）又は抗IRAK抗体（林原生化学研究所株式会社製）で免疫沈降して、文献（Immunity 11, 115-122, 1999）記載のように、インビトロキナーゼアッセイを行い、GST-c-Jun溶解蛋白質（GST-c-Jun）を基質としたJNK活性及びIRAKの活性を測定した（図10, 11における上段；GST-c-Jun, Auto）。

【0060】また、上記細胞溶解物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移し、この膜を抗JNK抗体（サンタクルス社製）又は抗IRAK抗体（Transduction Laboratories社製）でブロットして、エンハンスド・ケミルミネッセンス装置（デュポン社製）を使用して視覚化した（図10, 11における下段；WB）。以上の結果か

ら、CpG ODNは野生型マウス由来のマクロファージのJNK及びIRAKを活性化するが、TLR9ノックアウトマウス由来のマクロファージでは全く活性化しないことがわかった（図10, 11）。したがって、CpG ODNを介する情報伝達はTLR9に依存していることがわかった。

【0061】

【発明の効果】メチル化されていないCpGモチーフを含有するバクテリア由来DNAは免疫細胞を非常に活性化し、Th1の応答を誘導するが、そのバクテリア由来DNAを認識する受容体は知られていなかった。本発明により、細菌DNAの非メチル化CpG配列を含むオリゴヌクレオチドの受容体が明らかとなったことから、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識するTLRファミリーのメンバー受容体タンパク質TLR9や、それをコードする遺伝子DNA等は、細菌性疾患等の診断や、治療に用いることができ、またTLR9ノックアウト動物を用いると、バクテリア由来DNAの分子レベルにおける作用機作を明らかにすることが可能となる。

【0062】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
<120> Specific receptor that recognizes bacterial DNA
<130> A031P63
<140>
<141>
<160> 5
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 3257
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (107)..(3205)
<400> 1
ccgctgctgc ccctgtggga agggacctcg agtgtgaagc atccttcct gtagctgctg 60
tccagtctgc ccgccagacc ctctggagaa gccctgccc cccagc atg ggt ttc   115
                                     Met Gly Phe
                                     1
tgc cgc agc gcc ctg cac ccg ctg tet ctc ctg gtg cag gcc atc atg   163
Cys Arg Ser Ala Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln Ala Ile Met
      5              10              15
ctg gcc atg acc ctg gcc ctg ggt acc ttg cct gcc ttc cta ccc tgt   211
Leu Ala Met Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe Leu Pro Cys
      20              25              30              35
gag ctc cag ccc cac ggc ctg gtg aac tgc aac tgg ctg ttc ctg aag   259
Glu Leu Gln Pro His Gly Leu Val Asn Cys Asn Trp Leu Phe Leu Lys

```

40	45	50	
tct gtg ccc cac ttc tcc atg gca gca ccc cgt ggc aat gtc acc agc	307		
Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn Val Thr Ser			
55	60	65	
ctt tcc ttg tcc tcc aac cgc atc cac cac ctc cat gat tct gac ttt	355		
Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp Ser Asp Phe			
70	75	80	
gcc cac ctg ccc agc ctg cgg cat ctc aac ctc aag tgg aac tgc ccg	403		
Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp Asn Cys Pro			
85	90	95	
ccg gtt ggc ctc agc ccc atg cac ttc ccc tgc cac atg acc atc gag	451		
Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met Thr Ile Glu			
100	105	110	115
ccc agc acc ttc ttg gct gtg ccc acc ctg gaa gag cta aac ctg agc	499		
Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser			
120	125	130	
tac aac aac atc atg act gtg cct gcg ctg ccc aaa tcc ctc ata tcc	547		
Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser Leu Ile Ser			
135	140	145	
ctg tcc ctc agc cat acc aac atc ctg atg cta gac tct gcc agc ctc	595		
Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser Ala Ser Leu			
150	155	160	
gcc ggc ctg cat gcc ctg cgc ttc cta ttc atg gac ggc aac tgt tat	643		
Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly Asn Cys Tyr			
165	170	175	
tac aag aac ccc tgc agg cag gca ctg gag gtg gcc ccg ggt gcc ctc	691		
Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro Gly Ala Leu			
180	185	190	195
ctt ggc ctg ggc aac ctc acc cac ctg tca ctc aag tac aac aac ctc	739		
Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr Asn Asn Leu			
200	205	210	
act gtg gtg ccc cgc aac ctg cct tcc agc ctg gag tat ctg ctg ttg	787		
Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr Leu Leu Leu			
215	220	225	
tcc tac aac cgc atc gtc aaa ctg gcg cct gag gac ctg gcc aat ctg	835		
Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu Ala Asn Leu			
230	235	240	
acc gcc ctg cgt gtg ctc gat gtg ggc gga aat tgc cgc cgc tgc gac	883		
Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg Arg Cys Asp			
245	250	255	
cac gct ccc aac ccc tgc atg gag tgc cct cgt cac ttc ccc cag cta	931		
His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe Pro Gln Leu			
260	265	270	275
cat ccc gat acc ttc agc cac ctg agc cgt ctt gaa ggc ctg gtg ttg	979		
His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly Leu Val Leu			
280	285	290	
aag gac agt tct ctc tcc tgg ctg aat gcc agt tgg ttc cgt ggg ctg	1027		
Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe Arg Gly Leu			
295	300	305	
gga aac ctc cga gtg ctg gac ctg agt gag aac ttc ctc tac aaa tgc	1075		



Gly	Asn	Leu	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn	Phe	Leu	Tyr	Lys	Cys	
	310						315					320				
atc	act	aaa	acc	aag	gcc	ttc	cag	ggc	cta	aca	cag	ctg	cgc	aag	ctt	1123
Ile	Thr	Lys	Thr	Lys	Ala	Phe	Gln	Gly	Leu	Thr	Gln	Leu	Arg	Lys	Leu	
	325						330					335				
aac	ctg	tcc	ttc	aat	tac	caa	aag	agg	gtg	tcc	ttt	gcc	cac	ctg	tct	1171
Asn	Leu	Ser	Phe	Asn	Tyr	Gln	Lys	Arg	Val	Ser	Phe	Ala	His	Leu	Ser	
340							345					350			355	
ctg	gcc	cct	tcc	ttc	ggg	agc	ctg	gtc	gcc	ctg	aag	gag	ctg	gac	atg	1219
Leu	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Ser	Leu	Val	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Met	
						360						365			370	
cac	ggc	atc	ttc	ttc	cgc	tca	ctc	gat	gag	acc	acg	ctc	cgg	cca	ctg	1267
His	Gly	Ile	Phe	Phe	Arg	Ser	Leu	Asp	Glu	Thr	Thr	Leu	Arg	Pro	Leu	
						375						380			385	
gcc	cgc	ctg	ccc	atg	ctc	cag	act	ctg	cgt	ctg	cag	atg	aac	ttc	atc	1315
Ala	Arg	Leu	Pro	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Leu	Gln	Met	Asn	Phe	Ile	
						390						395			400	
aac	cag	gcc	cag	ctc	ggc	atc	ttc	agg	gcc	ttc	cct	ggc	ctg	cgc	tac	1363
Asn	Gln	Ala	Gln	Leu	Gly	Ile	Phe	Arg	Ala	Phe	Pro	Gly	Leu	Arg	Tyr	
						405						410			415	
gtg	gac	ctg	tgc	gac	aac	cgc	atc	agc	gga	gct	tgc	gag	ctg	aca	gcc	1411
Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Asn	Arg	Ile	Ser	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	
						420						425			430	
acc	atg	ggg	gag	gca	gat	gga	ggg	gag	aag	gtc	tgg	ctg	cag	cct	ggg	1459
Thr	Met	Gly	Glu	Ala	Asp	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Trp	Leu	Gln	Pro	Gly	
						440						445			450	
gac	ctt	gct	ccg	gcc	cca	gtg	gac	act	ccc	agc	tct	gaa	gac	ttc	agg	1507
Asp	Leu	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	Phe	Arg	
						455						460			465	
ccc	aac	tgc	agc	acc	ctc	aac	ttc	acc	ttg	gat	ctg	tca	cgg	aac	aac	1555
Pro	Asn	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Arg	Asn	Asn	
						470						475			480	
ctg	gtg	acc	gtg	cag	ccg	gag	atg	ttt	gcc	cag	ctc	tgc	cac	ctg	cag	1603
Leu	Val	Thr	Val	Gln	Pro	Glu	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Ser	His	Leu	Gln	
						485						490			495	
tgc	ctg	cgc	ctg	agc	cac	aac	tgc	atc	tgc	cag	gca	gtc	aat	ggc	tcc	1651
Cys	Leu	Arg	Leu	Ser	His	Asn	Cys	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	Asn	Gly	Ser	
						500						505			510	
cag	ttc	ctg	ccg	ctg	acc	ggt	ctg	cag	gtg	cta	gac	ctg	tcc	cac	aat	1699
Gln	Phe	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	
						520						525			530	
aag	ctg	gac	ctc	tac	cac	gag	cac	tca	ttc	acg	gag	cta	cca	cga	ctg	1747
Lys	Leu	Asp	Leu	Tyr	His	Glu	His	Ser	Phe	Thr	Glu	Leu	Pro	Arg	Leu	
						535						540			545	
gag	gcc	ctg	gac	ctc	agc	tac	aac	agc	cag	ccc	ttt	ggc	atg	cag	ggc	1795
Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Gly	Met	Gln	Gly	
						550						555			560	
gtg	ggc	cac	aac	ttc	agc	ttc	gtg	gct	cac	ctg	cgc	acc	ctg	cgc	cac	1843
Val	Gly	His	Asn	Phe	Ser	Phe	Val	Ala	His	Leu	Arg	Thr	Leu	Arg	His	
						565						570			575	

```

ctc agc ctg gcc cac aac aac atc cac agc caa gtg tcc cag cag ctc 1891
Leu Ser Leu Ala His Asn Asn Ile His Ser Gln Val Ser Gln Gln Leu
580          585          590          595
tgc agt acg tgc ctg cgg gcc ctg gac ttc agc ggc aat gca ctg ggc 1939
Cys Ser Thr Ser Leu Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly Asn Ala Leu Gly
          600          605          610
cat atg tgg gcc gag gga gac ctc tat ctg cac ttc ttc caa ggc ctg 1987
His Met Trp Ala Glu Gly Asp Leu Tyr Leu His Phe Phe Gln Gly Leu
          615          620          625
agc ggt ttg atc tgg ctg gac ttg tcc cag aac cgc ctg cac acc ctc 2035
Ser Gly Leu Ile Trp Leu Asp Leu Ser Gln Asn Arg Leu His Thr Leu
          630          635          640
ctg ccc caa acc ctg cgc aac ctc ccc aag agc cta cag gtg ctg cgt 2083
Leu Pro Gln Thr Leu Arg Asn Leu Pro Lys Ser Leu Gln Val Leu Arg
          645          650          655
ctc cgt gac aat tac ctg gcc ttc ttt aag tgg tgg agc ctc cac ttc 2131
Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ala Phe Phe Lys Trp Trp Ser Leu His Phe
660          665          670          675
ctg ccc aaa ctg gaa gtc ctc gac ctg gca gga aac cag ctg aag gcc 2179
Leu Pro Lys Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln Leu Lys Ala
          680          685          690
ctg acc aat ggc agc ctg cct gct ggc acc cgg ctc cgg agg ctg gat 2227
Leu Thr Asn Gly Ser Leu Pro Ala Gly Thr Arg Leu Arg Arg Leu Asp
          695          700          705
gtc agc tgc aac agc atc agc ttc gtg gcc ccc ggc ttc ttt tcc aag 2275
Val Ser Cys Asn Ser Ile Ser Phe Val Ala Pro Gly Phe Phe Ser Lys
          710          715          720
gcc aag gag ctg cga gag ctc aac ctt agc gcc aac gcc ctc aag aca 2323
Ala Lys Glu Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ala Leu Lys Thr
          725          730          735
gtg gac cac tcc tgg ttt ggg ccc ctg gcg agt gcc ctg caa ata cta 2371
Val Asp His Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ala Ser Ala Leu Gln Ile Leu
740          745          750          755
gat gta agc gcc aac cct ctg cac tgc gcc tgt ggg gcg gcc ttt atg 2419
Asp Val Ser Ala Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala Ala Phe Met
          760          765          770
gac ttc ctg ctg gag gtg cag gct gcc gtg ccc ggt ctg ccc agc cgg 2467
Asp Phe Leu Leu Glu Val Gln Ala Ala Val Pro Gly Leu Pro Ser Arg
          775          780          785
gtg aag tgt ggc agt ccg ggc cag ctc cag ggc ctc agc atc ttt gca 2515
Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Leu Ser Ile Phe Ala
          790          795          800
cag gac ctg cgc ctc tgc ctg gat gag gcc ctc tcc tgg gac tgt ttc 2563
Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Ala Leu Ser Trp Asp Cys Phe
          805          810          815
gcc ctc tgc ctg ctg gct gtg gct ctg ggc ctg ggt gtg ccc atg ctg 2611
Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Val Pro Met Leu
820          825          830          835
cat cac ctc tgt ggc tgg gac ctc tgg tac tgc ttc cac ctg tgc ctg 2659
His His Leu Cys Gly Trp Asp Leu Trp Tyr Cys Phe His Leu Cys Leu

```

```

      840      845      850
gcc tgg ctt ccc tgg cgg ggg cgg caa agt ggg cga gat gag gat gcc 2707
Ala Trp Leu Pro Trp Arg Gly Arg Gln Ser Gly Arg Asp Glu Asp Ala

      855      860      865
ctg ccc tac gat gcc ttc gtg gtc ttc gac aaa acg cag agc gca gtg 2755
Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Thr Gln Ser Ala Val

      870      875      880
gca gac tgg gtg tac aac gag ctt cgg ggg cag ctg gag gag tgc cgt 2803
Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Gly Gln Leu Glu Glu Cys Arg

      885      890      895
ggg cgc tgg gca ctc cgc ctg tgc ctg gag gaa cgc gac tgg ctg cct 2851
Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp Trp Leu Pro
900      905      910      915
ggc aaa acc ctc ttt gag aac ctg tgg gcc tcg gtc tat ggc agc cgc 2899
Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr Gly Ser Arg

      920      925      930
aag acg ctg ttt gtg ctg gcc cac acg gac cgg gtc agt ggt ctc ttg 2947
Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser Gly Leu Leu

      935      940      945
cgc gcc agc ttc ctg ctg gcc cag cag cgc ctg ctg gag gac cgc aag 2995
Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu Asp Arg Lys

      950      955      960
gac gtc gtg gtg ctg gtg atc ctg agc cct gac ggc cgc cgc tcc cgc 3043
Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg Arg Ser Arg

      965      970      975
tac gtg cgg ctg cgc cag cgc ctc tgc cgc cag agt gtc ctc ctc tgg 3091
Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val Leu Leu Trp
980      985      990      995
ccc cac cag ccc agt ggt cag cgc agc ttc tgg gcc cag ctg ggc atg 3139
Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln Leu Gly Met

      1000      1005      1010
gcc ctg acc agg gac aac cac cac ttc tat aac cgg aac ttc tgc cag 3187
Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg Asn Phe Cys Gln

      1015      1020      1025
gga ccc acg gcc gaa tag ccgtgagccg gaatcctgca cgggtgccacc 3235
Gly Pro Thr Ala Glu

      1030
tccacactca cctcacctct gc 3257

<210> 2
<211> 1032
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Gly Phe Cys Arg Ser Ala Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln
  1          5          10          15
Ala Ile Met Leu Ala Met Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe
      20          25          30
Leu Pro Cys Glu Leu Gln Pro His Gly Leu Val Asn Cys Asn Trp Leu
      35          40          45
Phe Leu Lys Ser Val Pro His Phe Ser Met Ala Ala Pro Arg Gly Asn

```

50	55	60			
Val Thr Ser Leu Ser Leu Ser Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asp					
65	70	75	80		
Ser Asp Phe Ala His Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Trp					
	85	90	95		
Asn Cys Pro Pro Val Gly Leu Ser Pro Met His Phe Pro Cys His Met					
100	105	110			
Thr Ile Glu Pro Ser Thr Phe Leu Ala Val Pro Thr Leu Glu Glu Leu					
115	120	125			
Asn Leu Ser Tyr Asn Asn Ile Met Thr Val Pro Ala Leu Pro Lys Ser					
130	135	140			
Leu Ile Ser Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Met Leu Asp Ser					
145	150	155	160		
Ala Ser Leu Ala Gly Leu His Ala Leu Arg Phe Leu Phe Met Asp Gly					
	165	170	175		
Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Arg Gln Ala Leu Glu Val Ala Pro					
180	185	190			
Gly Ala Leu Leu Gly Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Ser Leu Lys Tyr					
195	200	205			
Asn Asn Leu Thr Val Val Pro Arg Asn Leu Pro Ser Ser Leu Glu Tyr					
210	215	220			
Leu Leu Leu Ser Tyr Asn Arg Ile Val Lys Leu Ala Pro Glu Asp Leu					
225	230	235	240		
Ala Asn Leu Thr Ala Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg					
	245	250	255		
Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Met Glu Cys Pro Arg His Phe					
260	265	270			
Pro Gln Leu His Pro Asp Thr Phe Ser His Leu Ser Arg Leu Glu Gly					
275	280	285			
Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu Ser Trp Leu Asn Ala Ser Trp Phe					
290	295	300			
Arg Gly Leu Gly Asn Leu Arg Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu					
305	310	315	320		
Tyr Lys Cys Ile Thr Lys Thr Lys Ala Phe Gln Gly Leu Thr Gln Leu					
	325	330	335		
Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Gln Lys Arg Val Ser Phe Ala					
340	345	350			
His Leu Ser Leu Ala Pro Ser Phe Gly Ser Leu Val Ala Leu Lys Glu					
355	360	365			
Leu Asp Met His Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asp Glu Thr Thr Leu					
370	375	380			
Arg Pro Leu Ala Arg Leu Pro Met Leu Gln Thr Leu Arg Leu Gln Met					
385	390	395	400		
Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Gly Ile Phe Arg Ala Phe Pro Gly					
	405	410	415		
Leu Arg Tyr Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Ala Ser Glu					
420	425	430			
Leu Thr Ala Thr Met Gly Glu Ala Asp Gly Gly Glu Lys Val Trp Leu					
435	440	445			
Gln Pro Gly Asp Leu Ala Pro Ala Pro Val Asp Thr Pro Ser Ser Glu					

450	455	460
Asp Phe Arg Pro Asn Cys Ser Thr Leu Asn Phe Thr Leu Asp Leu Ser		
465	470	475
Arg Asn Asn Leu Val Thr Val Gln Pro Glu Met Phe Ala Gln Leu Ser		
485	490	495
His Leu Gln Cys Leu Arg Leu Ser His Asn Cys Ile Ser Gln Ala Val		
500	505	510
Asn Gly Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Gly Leu Gln Val Leu Asp Leu		
515	520	525
Ser His Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Glu His Ser Phe Thr Glu Leu		
530	535	540
Pro Arg Leu Glu Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Gly		
545	550	555
Met Gln Gly Val Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Arg Thr		
565	570	575
Leu Arg His Leu Ser Leu Ala His Asn Asn Ile His Ser Gln Val Ser		
580	585	590
Gln Gln Leu Cys Ser Thr Ser Leu Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly Asn		
595	600	605
Ala Leu Gly His Met Trp Ala Glu Gly Asp Leu Tyr Leu His Phe Phe		
610	615	620
Gln Gly Leu Ser Gly Leu Ile Trp Leu Asp Leu Ser Gln Asn Arg Leu		
625	630	635
His Thr Leu Leu Pro Gln Thr Leu Arg Asn Leu Pro Lys Ser Leu Gln		
645	650	655
Val Leu Arg Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ala Phe Phe Lys Trp Trp Ser		
660	665	670
Leu His Phe Leu Pro Lys Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln		
675	680	685
Leu Lys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Leu Pro Ala Gly Thr Arg Leu Arg		
690	695	700
Arg Leu Asp Val Ser Cys Asn Ser Ile Ser Phe Val Ala Pro Gly Phe		
705	710	715
Phe Ser Lys Ala Lys Glu Leu Arg Glu Leu Asn Leu Ser Ala Asn Ala		
725	730	735
Leu Lys Thr Val Asp His Ser Trp Phe Gly Pro Leu Ala Ser Ala Leu		
740	745	750
Gln Ile Leu Asp Val Ser Ala Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala		
755	760	765
Ala Phe Met Asp Phe Leu Leu Glu Val Gln Ala Ala Val Pro Gly Leu		
770	775	780
Pro Ser Arg Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Leu Ser		
785	790	795
Ile Phe Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Ala Leu Ser Trp		
805	810	815
Asp Cys Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Val		
820	825	830
Pro Met Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Leu Trp Tyr Cys Phe His		
835	840	845
Leu Cys Leu Ala Trp Leu Pro Trp Arg Gly Arg Gln Ser Gly Arg Asp		

850                      855                      860  
 Glu Asp Ala Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Thr Gln  
 865                      870                      875                      880  
 Ser Ala Val Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Gly Gln Leu Glu  
                     885                      890                      895  
 Glu Cys Arg Gly Arg Trp Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Glu Arg Asp  
                     900                      905                      910  
 Trp Leu Pro Gly Lys Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Val Tyr  
                     915                      920                      925  
 Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser  
                     930                      935                      940  
 Gly Leu Leu Arg Ala Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu  
 945                      950                      955                      960  
 Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Ser Pro Asp Gly Arg  
                     965                      970                      975  
 Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val  
                     980                      985                      990  
 Leu Leu Trp Pro His Gln Pro Ser Gly Gln Arg Ser Phe Trp Ala Gln  
                     995                      1000                      1005  
 Leu Gly Met Ala Leu Thr Arg Asp Asn His His Phe Tyr Asn Arg Asn  
                     1010                      1015                      1020  
 Phe Cys Gln Gly Pro Thr Ala Glu

1025

1030

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3471

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (107)..(3205)

&lt;400&gt; 3

tgaagtgctc acttctctcaa ttctctgaga gacctggtg tggaacatca ttctctgccg 60  
 cccagtttgt cagaggagac ctggggagaa tcttccatct cccaac atg gtt etc 115

Met Val Leu

1

cgt cga agg act ctg cac ccc ttg tcc etc ctg gta cag gct gca gtg 163  
 Arg Arg Arg Thr Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln Ala Ala Val

5

10

15

ctg gct gag act ctg gcc ctg ggt acc ctg cct gcc ttc cta ccc tgt 211  
 Leu Ala Glu Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe Leu Pro Cys

20

25

30

35

gag ctg aag cct cat ggc ctg gtg gac tgc aat tgg ctg ttc ctg aag 259  
 Glu Leu Lys Pro His Gly Leu Val Asp Cys Asn Trp Leu Phe Leu Lys

40

45

50

tct gta ccc cgt ttc tct gcg gca gca tcc tgc tcc aac atc acc cgc 307  
 Ser Val Pro Arg Phe Ser Ala Ala Ala Ser Cys Ser Asn Ile Thr Arg

55

60

65

etc tcc ttg atc tcc aac cgt atc cac cac ctg cac aac tcc gac ttc 355  
 Leu Ser Leu Ile Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asn Ser Asp Phe

70

75

80

gtc cac ctg tcc aac ctg cgg cag ctg aac ctc aag tgg aac tgt cca 403  
 Val His Leu Ser Asn Leu Arg Gln Leu Asn Leu Lys Trp Asn Cys Pro  
 85 90 95  
 ccc act ggc ctt agc ccc ttg cac ttc tct tgc cac atg acc att gag 451  
 Pro Thr Gly Leu Ser Pro Leu His Phe Ser Cys His Met Thr Ile Glu  
 100 105 110 115  
 ccc aga acc ttc ctg gct atg cgt aca ctg gag gag ctg aac ctg agc 499  
 Pro Arg Thr Phe Leu Ala Met Arg Thr Leu Glu Glu Leu Asn Leu Ser  
 120 125 130  
 tat aat ggt atc acc act gtg ccc cga ctg ccc agc tcc ctg gtg aat 547  
 Tyr Asn Gly Ile Thr Thr Val Pro Arg Leu Pro Ser Ser Leu Val Asn  
 135 140 145  
 ctg agc ctg agc cac acc aac atc ctg gtt cta gat gct aac agc ctc 595  
 Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Val Leu Asp Ala Asn Ser Leu  
 150 155 160  
 gcc ggc cta tac agc ctg cgc gtt ctc ttc atg gac ggg aac tgc tac 643  
 Ala Gly Leu Tyr Ser Leu Arg Val Leu Phe Met Asp Gly Asn Cys Tyr  
 165 170 175  
 tac aag aac ccc tgc aca gga gcg gtg aag gtg acc cca ggc gcc ctc 691  
 Tyr Lys Asn Pro Cys Thr Gly Ala Val Lys Val Thr Pro Gly Ala Leu  
 180 185 190 195  
 ctg ggc ctg agc aat ctc acc cat ctg tct gtg aag tat aac aac ctc 739  
 Leu Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Leu Ser Val Lys Tyr Asn Asn Leu  
 200 205 210  
 aca aag gtg ccc cgc caa ctg ccc ccc agc ctg gag tac ctc ctg gtg 787  
 Thr Lys Val Pro Arg Gln Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr Leu Leu Val  
 215 220 225  
 tcc tat aac ctc att gtc aag ctg ggg cct gaa gac ctg gcc aat ctg 835  
 Ser Tyr Asn Leu Ile Val Lys Leu Gly Pro Glu Asp Leu Ala Asn Leu  
 230 235 240  
 acc tcc ctt cga gta ctt gat gtg ggt ggg aat tgc cgt cgc tgc gac 883  
 Thr Ser Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg Arg Cys Asp  
 245 250 255  
 cat gcc ccc aat ccc tgt ata gaa tgt ggc caa aag tcc ctc cac ctg 931  
 His Ala Pro Asn Pro Cys Ile Glu Cys Gly Gln Lys Ser Leu His Leu  
 260 265 270 275  
 cac cct gag acc ttc cat cac ctg agc cat ctg gaa ggc ctg gtg ctg 979  
 His Pro Glu Thr Phe His His Leu Ser His Leu Glu Gly Leu Val Leu  
 280 285 290  
 aag gac agc tct ctc cat aca ctg aac tct tcc tgg ttc caa ggt ctg 1027  
 Lys Asp Ser Ser Leu His Thr Leu Asn Ser Ser Trp Phe Gln Gly Leu  
 295 300 305  
 gtc aac ctc tgc gtg ctg gac cta agc gag aac ttt ctc tat gaa agc 1075  
 Val Asn Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu Tyr Glu Ser  
 310 315 320  
 atc aac cac acc aat gcc ttt cag aac cta acc cgc ctg cgc aag ctc 1123  
 Ile Asn His Thr Asn Ala Phe Gln Asn Leu Thr Arg Leu Arg Lys Leu  
 325 330 335  
 aac ctg tcc ttc aat tac cgc aag aag gta tcc ttt gcc cgc ctc cac 1171  
 Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Val Ser Phe Ala Arg Leu His

340	345	350	355	
ctg gca agt tcc ttc aag aac ctg gtg tca ctg cag gag ctg aac atg				1219
Leu Ala Ser Ser Phe Lys Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu Leu Asn Met				
	360	365	370	
aac ggc atc ttc ttc cgc tgc ctc aac aag tac acg ctc aga tgg ctg				1267
Asn Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asn Lys Tyr Thr Leu Arg Trp Leu				
	375	380	385	
gcc gat ctg ccc aaa ctc cac act ctg cat ctt caa atg aac ttc atc				1315
Ala Asp Leu Pro Lys Leu His Thr Leu His Leu Gln Met Asn Phe Ile				
	390	395	400	
aac cag gca cag ctc agc atc ttt ggt acc ttc cga gcc ctt cgc ttt				1363
Asn Gln Ala Gln Leu Ser Ile Phe Gly Thr Phe Arg Ala Leu Arg Phe				
	405	410	415	
gtg gac ttg tca gac aat cgc atc agt ggg cct tca acg ctg tca gaa				1411
Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Pro Ser Thr Leu Ser Glu				
420	425	430	435	
gcc acc cct gaa gag gca gat gat gca gag cag gag gag ctg ttg tct				1459
Ala Thr Pro Glu Glu Ala Asp Asp Ala Glu Gln Glu Glu Leu Leu Ser				
	440	445	450	
gcg gat cct cac cca gct cca ctg agc acc cct gct tct aag aac ttc				1507
Ala Asp Pro His Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser Lys Asn Phe				
	455	460	465	
atg gac agg tgt aag aac ttc aag ttc acc atg gac ctg tct cgg aac				1555
Met Asp Arg Cys Lys Asn Phe Lys Phe Thr Met Asp Leu Ser Arg Asn				
	470	475	480	
aac ctg gtg act atc aag cca gag atg ttt gtc aat ctc tca cgc ctc				1603
Asn Leu Val Thr Ile Lys Pro Glu Met Phe Val Asn Leu Ser Arg Leu				
	485	490	495	
cag tgt ctt agc ctg agc cac aac tcc att gca cag gct gtc aat ggc				1651
Gln Cys Leu Ser Leu Ser His Asn Ser Ile Ala Gln Ala Val Asn Gly				
500	505	510	515	
tct cag ttc ctg ccg ctg act aat ctg cag gtg ctg gac ctg tcc cat				1699
Ser Gln Phe Leu Pro Leu Thr Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser His				
	520	525	530	
aac aaa ctg gac ttg tac cac tgg aaa tgc ttc agt gag cta cca cag				1747
Asn Lys Leu Asp Leu Tyr His Trp Lys Ser Phe Ser Glu Leu Pro Gln				
	535	540	545	
ttg cag gcc ctg gac ctg agc tac aac agc cag ccc ttt agc atg aag				1795
Leu Gln Ala Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Ser Gln Pro Phe Ser Met Lys				
	550	555	560	
ggt ata ggc cac aat ttc agt ttt gtg gcc cat ctg tcc atg cta cac				1843
Gly Ile Gly His Asn Phe Ser Phe Val Ala His Leu Ser Met Leu His				
	565	570	575	
agc ctt agc ctg gca cac aat gac att cat acc cgt gtg tcc tca cat				1891
Ser Leu Ser Leu Ala His Asn Asp Ile His Thr Arg Val Ser Ser His				
580	585	590	595	
ctc aac agc aac tca gtg agg ttt ctt gac ttc agc ggc aac ggt atg				1939
Leu Asn Ser Asn Ser Val Arg Phe Leu Asp Phe Ser Gly Asn Gly Met				
	600	605	610	
ggc cgc atg tgg gat gag ggg ggc ctt tat ctc cat ttc ttc caa ggc				1987



Gly Arg Met Trp Asp Glu Gly Gly Leu Tyr Leu His Phe Phe Gln Gly	
615 620 625	
ctg agt ggc ctg ctg aag ctg gac ctg tct caa aat aac ctg cat atc	2035
Leu Ser Gly Leu Leu Lys Leu Asp Leu Ser Gln Asn Asn Leu His Ile	
630 635 640	
ctc cgg ccc cag aac ctt gac aac ctc ccc aag agc ctg aag ctg ctg	2083
Leu Arg Pro Gln Asn Leu Asp Asn Leu Pro Lys Ser Leu Lys Leu Leu	
645 650 655	
agc ctc cga gac aac tac cta tct ttc ttt aac tgg acc agt ctg tcc	2131
Ser Leu Arg Asp Asn Tyr Leu Ser Phe Phe Asn Trp Thr Ser Leu Ser	
660 665 670 675	
ttc ctg ccc aac ctg gaa gtc cta gac ctg gca ggc aac cag cta aag	2179
Phe Leu Pro Asn Leu Glu Val Leu Asp Leu Ala Gly Asn Gln Leu Lys	
680 685 690	
gcc ctg acc aat ggc acc ctg cct aat ggc acc ctc ctc cag aaa ctg	2227
Ala Leu Thr Asn Gly Thr Leu Pro Asn Gly Thr Leu Leu Gln Lys Leu	
695 700 705	
gat gtc agc agc aac agt atc gtc tct gtg gtc cca gcc ttc ttc gct	2275
Asp Val Ser Ser Asn Ser Ile Val Ser Val Val Pro Ala Phe Phe Ala	
710 715 720	
ctg gcg gtc gag ctg aaa gag gtc aac ctc agc cac aac att ctc aag	2323
Leu Ala Val Glu Leu Lys Glu Val Asn Leu Ser His Asn Ile Leu Lys	
725 730 735	
acg gtg gat cgc tcc tgg ttt ggg ccc att gtg atg aac ctg aca gtt	2371
Thr Val Asp Arg Ser Trp Phe Gly Pro Ile Val Met Asn Leu Thr Val	
740 745 750 755	
cta gac gtg aga agc aac cct ctg cac tgt gcc tgt ggg gca gcc ttc	2419
Leu Asp Val Arg Ser Asn Pro Leu His Cys Ala Cys Gly Ala Ala Phe	
760 765 770	
gta gac tta ctg ttg gag gtg cag acc aag gtg cct ggc ctg gct aat	2467
Val Asp Leu Leu Leu Glu Val Gln Thr Lys Val Pro Gly Leu Ala Asn	
775 780 785	
ggg gtg aag tgt ggc agc ccc ggc cag ctg cag ggc cgt agc atc ttc	2515
Gly Val Lys Cys Gly Ser Pro Gly Gln Leu Gln Gly Arg Ser Ile Phe	
790 795 800	
gca cag gac ctg cgg ctg tgc ctg gat gag gtc ctc tct tgg gac tgc	2563
Ala Gln Asp Leu Arg Leu Cys Leu Asp Glu Val Leu Ser Trp Asp Cys	
805 810 815	
ttt ggc ctt tca ctc ttg gct gtg gcc gtg ggc atg gtg gtg cct ata	2611
Phe Gly Leu Ser Leu Leu Ala Val Ala Val Gly Met Val Val Pro Ile	
820 825 830 835	
ctg cac cat ctc tgc ggc tgg gac gtc tgg tac tgt ttt cat ctg tgc	2659
Leu His His Leu Cys Gly Trp Asp Val Trp Tyr Cys Phe His Leu Cys	
840 845 850	
ctg gca tgg cta cct ttg ctg gcc cgc agc cga cgc agc gcc caa gct	2707
Leu Ala Trp Leu Pro Leu Leu Ala Arg Ser Arg Arg Ser Ala Gln Ala	
855 860 865	
ctc ccc tat gat gcc ttc gtg gtg ttc gat aag gca cag agc gca gtt	2755
Leu Pro Tyr Asp Ala Phe Val Val Phe Asp Lys Ala Gln Ser Ala Val	
870 875 880	

gcg gac tgg gtg tat aac gag ctg cgg gtg cgg ctg gag gag cgg cgc 2803  
 Ala Asp Trp Val Tyr Asn Glu Leu Arg Val Arg Leu Glu Glu Arg Arg  
 885 890 895  
 ggt cgc cga gcc cta cgc ttg tgt ctg gag gac cga gat tgg ctg cct 2851  
 Gly Arg Arg Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Asp Arg Asp Trp Leu Pro  
 900 905 910 915  
 ggc cag acg ctc ttc gag aac ctc tgg gct tcc atc tat ggg agc cgc 2899  
 Gly Gln Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Ile Tyr Gly Ser Arg  
 920 925 930  
 aag act cta ttt gtg ctg gcc cac acg gac cgc gtc agt ggc ctc ctg 2947  
 Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser Gly Leu Leu  
 935 940 945  
 cgc acc agc ttc ctg ctg gct cag cag cgc ctg ttg gaa gac cgc aag 2995  
 Arg Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu Asp Arg Lys  
 950 955 960  
 gac gtg gtg gtg ttg gtg atc ctg cgt ccg gat gcc cac cgc tcc cgc 3043  
 Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Arg Pro Asp Ala His Arg Ser Arg  
 965 970 975  
 tat gtg cga ctg cgc cag cgt ctc tgc cgc cag agt gtg ctc ttc tgg 3091  
 Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val Leu Phe Trp  
 980 985 990 995  
 ccc cag cag ccc aac ggg cag ggg ggc ttc tgg gcc cag ctg agt aca 3139  
 Pro Gln Gln Pro Asn Gly Gln Gly Gly Phe Trp Ala Gln Leu Ser Thr  
 1000 1005 1010  
 gcc ctg act agg gac aac cgc cac ttc tat aac cag aac ttc tgc cgg 3187  
 Ala Leu Thr Arg Asp Asn Arg His Phe Tyr Asn Gln Asn Phe Cys Arg  
 1015 1020 1025  
 gga cct aca gca gaa tag ctgagagcaa cagctggaaa cagctgcatc 3235  
 Gly Pro Thr Ala Glu  
 1030  
 ttcatgcctg gttcccgagt tgctctgcct gccttgctct gtcttactac accgtatatt 3295  
 ggcaagtgcg caatatatgc taccaagcca ccaggccac ggagcaaagg ttggcagtaa 3355  
 agggtagttt tcttcccatg catcttcag gagagtgaag atagacacca gaccacaca 3415  
 gaacaggact ggagttcatt ctctgccct ccacccact ttgctgtct ctgtat 3471  
 <210> 4  
 <211> 1032  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 4  
 Met Val Leu Arg Arg Arg Thr Leu His Pro Leu Ser Leu Leu Val Gln  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Val Leu Ala Glu Thr Leu Ala Leu Gly Thr Leu Pro Ala Phe  
 20 25 30  
 Leu Pro Cys Glu Leu Lys Pro His Gly Leu Val Asp Cys Asn Trp Leu  
 35 40 45  
 Phe Leu Lys Ser Val Pro Arg Phe Ser Ala Ala Ala Ser Cys Ser Asn  
 50 55 60  
 Ile Thr Arg Leu Ser Leu Ile Ser Asn Arg Ile His His Leu His Asn  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Phe Val His Leu Ser Asn Leu Arg Gln Leu Asn Leu Lys Trp

	85	90	95
Asn Cys Pro Pro Thr Gly Leu Ser Pro Leu His Phe Ser Cys His Met			
	100	105	110
Thr Ile Glu Pro Arg Thr Phe Leu Ala Met Arg Thr Leu Glu Glu Leu			
	115	120	125
Asn Leu Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Thr Val Pro Arg Leu Pro Ser Ser			
	130	135	140
Leu Val Asn Leu Ser Leu Ser His Thr Asn Ile Leu Val Leu Asp Ala			
	145	150	155
Asn Ser Leu Ala Gly Leu Tyr Ser Leu Arg Val Leu Phe Met Asp Gly			
	165	170	175
Asn Cys Tyr Tyr Lys Asn Pro Cys Thr Gly Ala Val Lys Val Thr Pro			
	180	185	190
Gly Ala Leu Leu Gly Leu Ser Asn Leu Thr His Leu Ser Val Lys Tyr			
	195	200	205
Asn Asn Leu Thr Lys Val Pro Arg Gln Leu Pro Pro Ser Leu Glu Tyr			
	210	215	220
Leu Leu Val Ser Tyr Asn Leu Ile Val Lys Leu Gly Pro Glu Asp Leu			
	225	230	235
Ala Asn Leu Thr Ser Leu Arg Val Leu Asp Val Gly Gly Asn Cys Arg			
	245	250	255
Arg Cys Asp His Ala Pro Asn Pro Cys Ile Glu Cys Gly Gln Lys Ser			
	260	265	270
Leu His Leu His Pro Glu Thr Phe His His Leu Ser His Leu Glu Gly			
	275	280	285
Leu Val Leu Lys Asp Ser Ser Leu His Thr Leu Asn Ser Ser Trp Phe			
	290	295	300
Gln Gly Leu Val Asn Leu Ser Val Leu Asp Leu Ser Glu Asn Phe Leu			
	305	310	315
Tyr Glu Ser Ile Asn His Thr Asn Ala Phe Gln Asn Leu Thr Arg Leu			
	325	330	335
Arg Lys Leu Asn Leu Ser Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Val Ser Phe Ala			
	340	345	350
Arg Leu His Leu Ala Ser Ser Phe Lys Asn Leu Val Ser Leu Gln Glu			
	355	360	365
Leu Asn Met Asn Gly Ile Phe Phe Arg Ser Leu Asn Lys Tyr Thr Leu			
	370	375	380
Arg Trp Leu Ala Asp Leu Pro Lys Leu His Thr Leu His Leu Gln Met			
	385	390	395
Asn Phe Ile Asn Gln Ala Gln Leu Ser Ile Phe Gly Thr Phe Arg Ala			
	405	410	415
Leu Arg Phe Val Asp Leu Ser Asp Asn Arg Ile Ser Gly Pro Ser Thr			
	420	425	430
Leu Ser Glu Ala Thr Pro Glu Glu Ala Asp Asp Ala Glu Gln Glu Glu			
	435	440	445
Leu Leu Ser Ala Asp Pro His Pro Ala Pro Leu Ser Thr Pro Ala Ser			
	450	455	460
Lys Asn Phe Met Asp Arg Cys Lys Asn Phe Lys Phe Thr Met Asp Leu			
	465	470	475
Ser Arg Asn Asn Leu Val Thr Ile Lys Pro Glu Met Phe Val Asn Leu			

	485		490		495
Ser	Arg	Leu	Gln	Cys	Leu
		Ser	Leu	Ser	His
		Asn	Ser	Ile	Ala
		Gln	Ala	Gln	Ala
	500		505		510
Val	Asn	Gly	Ser	Gln	Phe
		Leu	Pro	Leu	Thr
		Asn	Leu	Gln	Val
		Leu	Asp	Val	Leu
	515		520		525
Leu	Ser	His	Asn	Lys	Leu
		Asp	Leu	Tyr	His
		Trp	Lys	Ser	Phe
		Ser	Glu		
	530		535		540
Leu	Pro	Gln	Leu	Gln	Ala
		Leu	Asp	Leu	Ser
		Tyr	Asn	Ser	Gln
		Pro	Phe		
	545		550		555
Ser	Met	Lys	Gly	Ile	Gly
		His	Asn	Phe	Ser
		Phe	Val	Ala	His
		Leu	Ser		
		565		570	
Met	Leu	His	Ser	Leu	Ser
		Leu	Ala	His	Asn
		Asp	Ile	His	Thr
		Arg	Val		
	580		585		590
Ser	Ser	His	Leu	Asn	Ser
		Asn	Ser	Val	Arg
		Phe	Leu	Asp	Phe
		Ser	Gly		
	595		600		605
Asn	Gly	Met	Gly	Arg	Met
		Trp	Asp	Glu	Gly
		Gly	Gly	Leu	Tyr
		Leu	His	Phe	
	610		615		620
Phe	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly
		Leu	Leu	Lys	Leu
		Asp	Leu	Ser	Gln
		Asn	Asn		
	625		630		635
Leu	His	Ile	Leu	Arg	Pro
		Gln	Asn	Leu	Asp
		Asn	Leu	Pro	Lys
		Ser	Leu		
		645		650	
Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg
		Asp	Asn	Tyr	Leu
		Ser	Phe	Phe	Asn
		Trp	Thr		
	660		665		670
Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro
		Asn	Leu	Glu	Val
		Leu	Asp	Leu	Ala
		Gly	Asn		
	675		680		685
Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Thr
		Asn	Gly	Thr	Leu
		Pro	Asn	Gly	Thr
		Leu			
	690		695		700
Gln	Lys	Leu	Asp	Val	Ser
		Ser	Asn	Ser	Ile
		Val	Ser	Val	Val
		Pro	Ala		
	705		710		715
Phe	Phe	Ala	Leu	Ala	Val
		Glu	Leu	Lys	Glu
		Val	Asn	Leu	Ser
		His	Asn		
		725		730	
Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Asp
		Arg	Ser	Trp	Phe
		Gly	Pro	Ile	Val
		Met	Asn		
	740		745		750
Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val
		Arg	Ser	Asn	Pro
		Leu	His	Cys	Ala
		Cys	Gly		
	755		760		765
Ala	Ala	Phe	Val	Asp	Leu
		Leu	Leu	Glu	Val
		Gln	Thr	Lys	Val
		Pro	Gly		
	770		775		780
Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Lys
		Cys	Gly	Ser	Pro
		Gly	Gln	Leu	Gln
		Arg			
	785		790		795
Ser	Ile	Phe	Ala	Gln	Asp
		Leu	Arg	Leu	Cys
		Leu	Asp	Glu	Val
		Leu	Ser		
		805		810	
Trp	Asp	Cys	Phe	Gly	Leu
		Ser	Leu	Leu	Ala
		Val	Ala	Val	Gly
		Met	Val		
	820		825		830
Val	Pro	Ile	Leu	His	His
		Leu	Cys	Gly	Trp
		Asp	Val	Trp	Tyr
		Cys	Phe		
	835		840		845
His	Leu	Cys	Leu	Ala	Trp
		Pro	Leu	Leu	Ala
		Arg	Ser	Arg	Arg
		Ser			
	850		855		860
Ala	Gln	Ala	Leu	Pro	Tyr
		Asp	Ala	Phe	Val
		Val	Phe	Asp	Lys
		Ala	Gln		
	865		870		875
Ser	Ala	Val	Ala	Asp	Trp
		Val	Tyr	Asn	Glu
		Leu	Arg	Val	Arg
		Leu	Glu		

885                      890                      895  
 Glu Arg Arg Gly Arg Arg Ala Leu Arg Leu Cys Leu Glu Asp Arg Asp  
 900                      905                      910  
 Trp Leu Pro Gly Gln Thr Leu Phe Glu Asn Leu Trp Ala Ser Ile Tyr  
 915                      920                      925  
 Gly Ser Arg Lys Thr Leu Phe Val Leu Ala His Thr Asp Arg Val Ser  
 930                      935                      940  
 Gly Leu Leu Arg Thr Ser Phe Leu Leu Ala Gln Gln Arg Leu Leu Glu  
 945                      950                      955                      960  
 Asp Arg Lys Asp Val Val Val Leu Val Ile Leu Arg Pro Asp Ala His  
 965                      970                      975  
 Arg Ser Arg Tyr Val Arg Leu Arg Gln Arg Leu Cys Arg Gln Ser Val  
 980                      985                      990  
 Leu Phe Trp Pro Gln Gln Pro Asn Gly Gln Gly Phe Trp Ala Gln  
 995                      1000                      1005  
 Leu Ser Thr Ala Leu Thr Arg Asp Asn Arg His Phe Tyr Asn Gln Asn  
 1010                      1015                      1020  
 Phe Cys Arg Gly Pro Thr Ala Glu  
 1025                      1030

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:CpG ODN

&lt;400&gt; 5

tccatgacgt tcctgatgct

20

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のTLR9ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

【図2】本発明のTLR9ノックアウトマウスのサザンブロット分析の結果を示す図である。

【図3】本発明のTLR9ノックアウトマウスの脾臓細胞におけるノーザンブロット分析の結果を示す図である。

【図4】本発明のTLR9ノックアウトマウスと野生型マウスのアミノ酸配列の比較結果を示す図である。

【図5】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN、PGN又はLPS誘導によるTNF $\alpha$ 、IL-6又はIL12の産生量の結果を示す図である。

【図6】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導による細胞増殖応答の結果を示す図である。

【図7】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるIL-12の産生量の結果を示す図である。

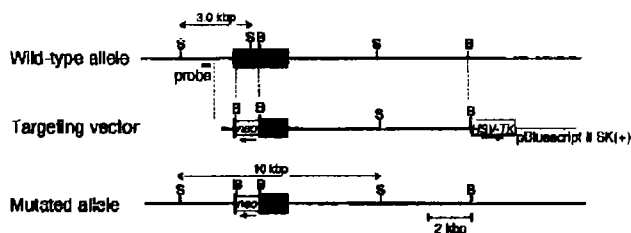
【図8】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるCD40、CD80、CD86及びMHCクラスIIの発現量の結果を示す図である。

【図9】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるNF- $\kappa$ Bの活性化の結果を示す図である。

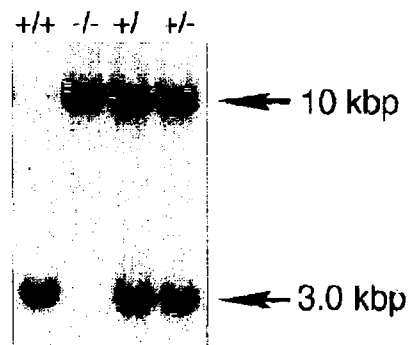
【図10】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるJNKの活性化の結果を示す図である。

【図11】本発明のTLR9ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるCpG ODN又はLPS誘導によるIRAKの活性化の結果を示す図である。

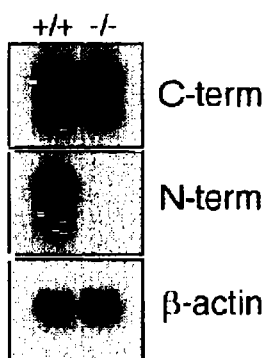
【図1】



【図2】



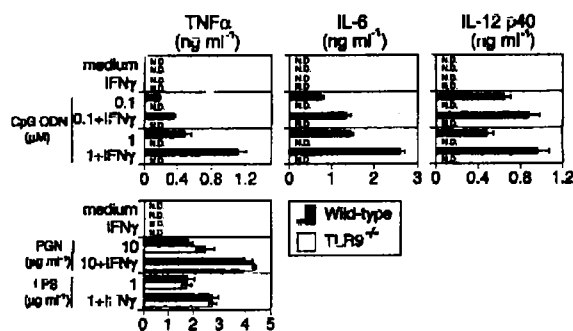
【図3】



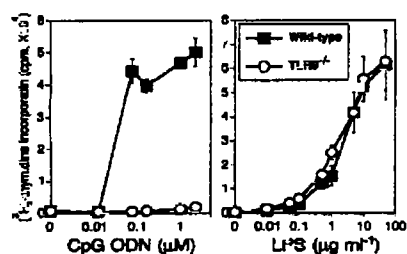
【図4】

+/+	87	TCC	AAC	CTG	CGG	CAG	CTG	AAC	CTC	AAG	TGG	AAC	TGT	CCA	CCC	ACT	GGC	CTT	AGC	CCC	TTG	CAC	TTC	TCT	TGC	110
		S	N	L	R	Q	L	N	L	K	W	N	C	P	P	T	G	L	S	P	L	H	F	S	C	
-/-	87	TCC	AAC	CTG	CGG	CAG	CTG	AAC	CTC	AAG	TGG	ATT	TIG	TCC	ACC	TGT	CCT	CGA	CGG	ATC	CGA	ACA	AAC	GAC	CCA	
		S	N	L	R	Q	L	N	L	K	W	J	L	S	T	C	P	R	R	I	R	T	N	D	P	
	87				90						96															
+/+		CAC	ATG	ACC	ATT	GAG	CCC	AGA	ACC	TTC	CTG	GCT	ATG	CGT	ACA	CTG	GAG	GAG	CTG	AAC	CTG	AGC	TAT	AAI	GGT	
		H	M	T	I	E	P	R	T	F	L	A	M	R	T	L	E	E	L	N	L	S	Y	N	G	
-/-		I	P	V	R	F	I	L	S	F	Y	C	R	S	P	Q	K	N	S	S	R	R	R	*		
		ACA	CCC	GTG	CGT	TTT	ATT	CTG	TCT	TIT	TAT	TGC	CGA	TCC	CCT	CAG	AAG	AAC	TCG	TCA	AGA	AGG	CGA	TAG		

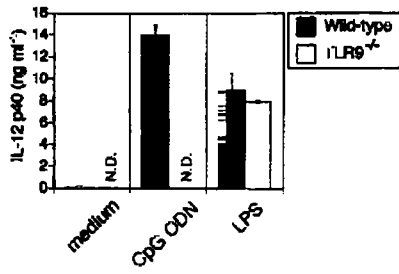
【図5】



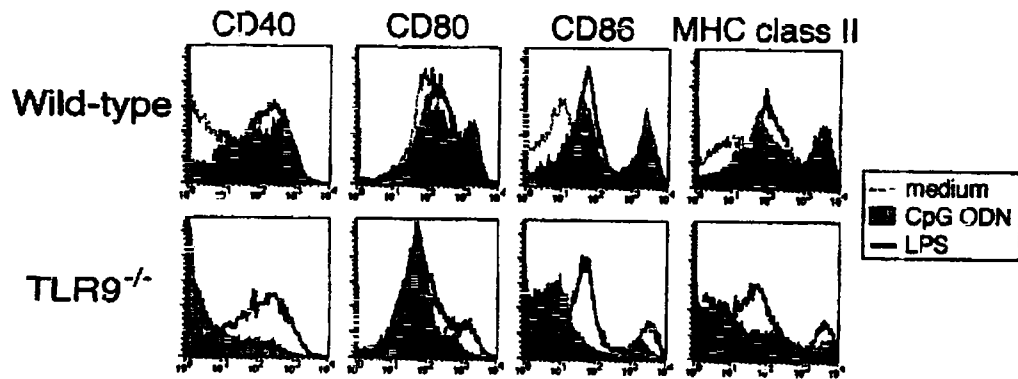
【図6】



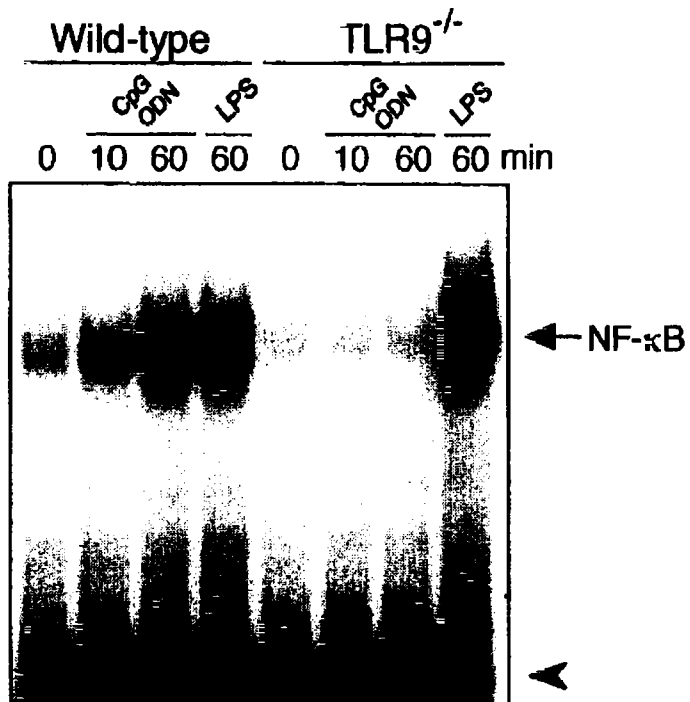
【図7】



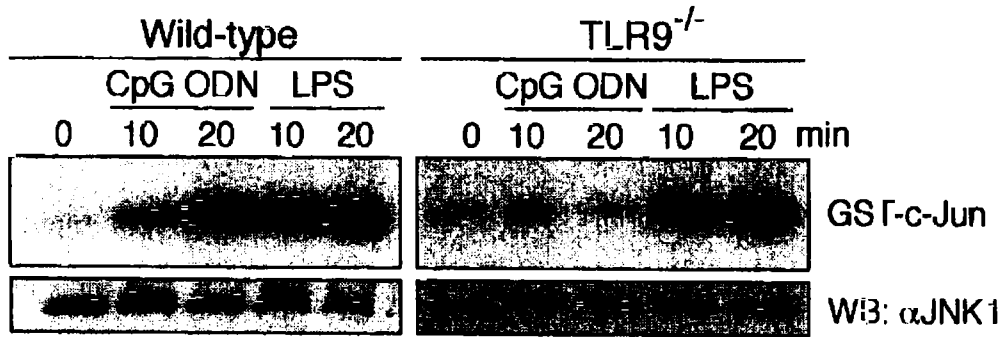
【図8】



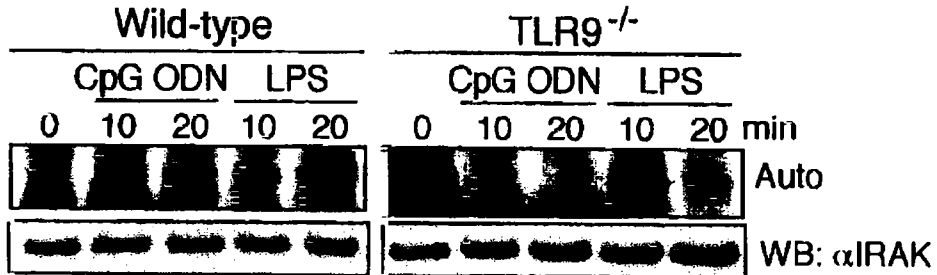
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 37/08		C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/005		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
	16/28		1/19
C 1 2 N 1/15			1/21
	1/19	C 1 2 Q 1/68	A
	1/21	G 0 1 N 33/15	Z
	5/10		33/50 Z
C 1 2 Q 1/68			33/566
G 0 1 N 33/15			33/577 B
	33/50	C 1 2 P 21/08	
	33/566	(C 1 2 Q 1/68	A
	33/577	C 1 2 R 1:91)	
// C 1 2 P 21/08		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 Q 1/68		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	B



Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB01 BB20 BB24  
BB51 CB01 CB17 DA36 FB02  
FB03 FB05 FB08  
4B024 BA44 BA63 CA04 DA02 DA06  
DA12 EA04 FA10 GA05 HA14  
HA15  
4B063 QA01 QA19 QQ43 QR08 QR32  
QR42 QR56 QS25 QS34 QX05  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15  
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90Y  
AA91X AA92X AB01 AB05  
AC10 BA02 CA24 CA25 CA43  
4C084 AA01 AA17 BA44 ZB132  
ZB262 ZB352  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA50 EA50 EA52 FA72  
FA74